



KONGERIKET NORGE
The Kingdom of Norway

09/807704 T/NO 99/00321

REC'D	0.8 NOV 1999
WIPO	PCT

N 099
321

4

Bekreftelse på patentsøknad nr

Certification of patent application no

1998 4896

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

► Det bekreftes herved at vedheftede dokument er nøyaktig utskrift/kopi av ovennevnte søknad, som opprinnelig inngitt 1998.10.21

► It is hereby certified that the annexed document is a true copy of the above-mentioned application, as originally filed on 1998.10.21

1999.11.04

Freddy Strømmen

Freddy Strømmen
Seksjonsleder

Ellen B. Olsen

Ellen B. Olsen



PATENTSTYRET
Styret for det industrielle rettsvern

1d
21. oktober 1998
TG/eah
O.nr. 127176

PATENTSTYRET

21.OKT98 984896

ANSØKER:

Marine Lipids AS
Storeidøya Industriområde
Postboks 165
8370 LEKNES

OPPFINNER:

Stig Jansson

TITTEL:

Fremgangsmåte ved separering av lipider og proteiner
fra biologisk materiale.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte ved separering og utvinning av materiale som er av organisk biologisk opprinnelse og som inneholder lipider og proteiner, spesielt separering og utvinning av slikt
5 materiale fra akvatiske organismer så som fisk.

Det er tidligere kjent metoder for utvinning og separering av forskjellige materialer fra levende organismer. Blant disse kan det nevnes metoder for utvinning av fett og oljer
10 fra fisk, pattedyr og planter, utvinning av proteiner og proteinholdig materiale fra dyr og planter, utvinning av fargestoffer, vitaminer etc. fra dyr- og plantemateriale etc.

Blant den teknikk som kommer nærmest foreliggende oppfinnelse er den fremgangsmåte som er beskrevet i NO patentsøknad nr. 93.3009, hvor det er angitt en fremgangsmåte for produksjon av oljer med høy oksydativ stabilitet fra marint biologisk råstoff, I denne tidligere
20 kjente fremgangsmåten fryses råstoffet hurtig inn med en innfrysningshastighet på $> 1^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ og bearbeides i frossen tilstand, hvorpå fettutskilles ved svak oppvarming ved at det smeltes ut fra råstoffet. I dette patentet beskrives hvordan innfrysing av utgangsmaterialet i
25 hovedsak skal skje for å bevare den oljekvalitet som ønskes i sluttproduktet, og hvilke momenter som virker inn ved en slik prosess. Imidlertid spesifiseres ikke meget angående den angitte svake oppvarming av materialet for å smelte fettut og oljene ut fra utgangsmaterialet.

30 Det er også tidligere kjent liknende metoder for utvinning av olje, så som via Norsk patent 43.956 og 38.027. Det er således kjent fra NO patent 43.956 å fryse fiskelever og opptine denne på i og for seg kjent måte fulgt av
35 separasjon av oljen for fremstilling av fiskeolje.

Likeledes er det kjent fra NO patent 38.027 å fryse fiskelever for å sprengne cellene i leveren og derved gjøre at fiskeleveroljen etter opptining kan separeres fra det

øvrige materialet. I ingen av disse patentene står det noe om hvordan opptiningen skal utføres, og heller ikke noe om hvilke effekter opptinningsprosessen vil ha på det opptinende materiale.

5

- Foreliggende oppfinnelse er en oppfinnerisk videreutvikling av de metoder som er beskrevet i de ovennevnte patenter/patentsøknader, og foreliggende metode kan også benyttes til utvinning og separering av materiale som er av organisk biologisk opprinnelse og som inneholder lipider og proteiner. Hensikten med en slik separering er å utvinne olje med et innhold av fett/olje (lipider) sammen med proteiner som foreligger i sin naturlige tilstand, det vil si som ikke er denaturerte. Hensikten med dette er at fett/oljefraksjonen hos forskjellige biologisk materiale inneholder substanser som er av stor ernæringsmessig samt medikamentell betydning, og det er derfor av stor viktighet å unngå å denaturere slike komponenter ved utskillelsen av fett/olje fra det biologiske materialet. Dette gjelder animalsk (marint og ikke-marint) så vel som vegetabilsk materiale, og blant vegetabilsk materiale kan det i denne forbindelsen nevnes utvinning av olje fra soya, oliven, solsikke etc.
- Idet utvinning av olje fra marint materiale er av de utvinningsformer som ligger nærmest opp til foreliggende oppfinnelse, vil effekter av oppvarming ved tradisjonell utvinning av marine oljer bli omtalt.
- Dagens metoder for utvinning av tran skjer ved at torskelever varmes off ved hjelp av vanndamp så mye at cellestrukturen ødelegges og proteiner denatureres. Denne oppvarming (damping) av råstoffet fører til at tranen, som ikke er løselig i vann, flyter opp og denne kan således skilles fra det vandige materialet ved sentrifugering, pressing, flotasjon eller dekantering.

Fiskeolje produseres som et biprodukt ved fiskemel-produksjonen. Kvaliteten på oljen reflekterer også dette. Prosessen for fremstilling av olje starter med våtpressing av råstoffet. Råstoffet varmebehandles ved oppvarming til mellom 70-90°C, og dette gjør at proteinene som er tilstede i materialet denatureres. Imidlertid blir fett/olje frigjort ved en slik behandling. Fett/olje kan derpå separeres ved de metoder som er nevnt ovenfor. Det har vært mulig å redusere tiden som råstoffet utsettes for denne oppvarming, og derved har det vært mulig å heve kvaliteten på produktet, men like fullt har det vært nødvendig med en slik dampbehandling for å skille ut de ønskede lipider.

15 I tillegg til at proteiner blir denaturert ved varmebehandling, vil også andre komponenter så som termisk labile antioksydanter, prooksydanter, enzymer og fettsyrer med lengere kjeder og/eller med stor umetningsgrad bli helt eller delvis ødelagt med en slik varmebehandlingsprosess

20 som er nevnt ovenfor. Dessuten vil tilførsel av store mengder energi for aktivering og høye reaksjonshastigheter ha en ugunstig innvirkning på oksydasjonsreaksjoner i materialet så som autooksydasjon, fotooksydasjon, enzymatisk oksydasjon og polymerisering.

25 Varmebehandling forårsaker også aktivering av oksydasjonsreaksjoner enten rent termisk eller gjennom reduksjon av innholdet av termolabile antioksydanter. For sterk oppvarming fører også til naturstoffer som bidrar til å gjøre stoffet stabilt mot harskning inaktiveres. Ved varmebehandling, og derved denaturering av proteiner, vil også metallioner bli frigjort. Eksempler er ferritin og hemoglobin som ved denaturering frigjør jern. Ioner av transisjonsmetaller som jern (Fe^{3+}) og kopper (Cu^{2+}) er

30 eksempler på sterke prooksydanter som bidrar til hurtigere oksydasjon av fett og derved lavere stabilitet.

Teknikker som unngår oppvarming av materialet i vesentlig grad har også vært benyttet til separasjon av olje og fett. Dette gjelder spesielt såkalt "kaldpressing" ved omkring 30-50°C av vegetabiliske oljer fra vegetabilisk materiale
 5 etter mekanisk bearbeiding av materialet, men her har ikke materialet på forhånd blitt utsatt for noen fryseprosess. "Kaldpressing" har også blitt foretatt ved utvinning av torskelevertran, men her blir ofte fettene, i tillegg til den moderate oppvarmingen, utsatt for oppvarming til 90°C
 10 for å effektivisere prosessen i de senere separasjonstrinn.

Målet med foreliggende oppfinnelse er å fremskaffe et lipid/protein-produkt med så lite denaturering av produktets komponenter som mulig, hvor prosessen er med på
 15 å stabilisere produktet, det vil si å utsette det for så lite oksydativt stress som mulig, samtidig som det kan bli unngått tilføring av luft (oksygen) og frigjøring av prooksydanter så som metallioner, samt hvor temperaturen kan holdes lav (under denatureingstemperaturen for
 20 proteinene i det biologiske materialet) og hvor prosessen kan utføres i mørke for å unngå fotooksydasjon av materialet.

Prosessen ifølge oppfinnelsen har som utgangspunkt et
 25 materiale av organisk biologisk opprinnelse (fiskelever, hvalspekk, soyabønner, oliven, solsikkefrø etc.) som inneholder lipider og proteiner. Dette materialet fryses til en lav temperatur. Denne frysetemperatur er ikke kritisk, men den ligger i et slikt område at membranene som
 30 omgir cellene i det innfrosne materiale blir "sprø" og brytes opp for å frigjøre innholdet av cellene. Normalt vil det være tilstrekkelig å fryse materialet til en temperatur i området 0 til -20°C, fortrinnsvis 0 til -10°C, mer foretrukket 0 til -6°C, selv om også andre
 35 temperaturområder vil være mulig så som temperaturer fra -3°C til -50°C, fortrinnsvis -5°C til -28°C.

Innfrysningshastigheten kan være relativt hurtig,

fortrinnsvis over 1°C/minutt, selv om heller ikke dette er av vesentlig betydning for prosessen ifølge oppfinnelsen.

Konsekvensen av frysing er fokusert på ompakking av membranlipidene. For depotfettet i biologisk materiale, som hovedsakelig består av triglycerider, har frysingen ingen vesentlige konsekvenser, andre enn at volumet i fettvakuolene minsker med ca 10%. For membranlipidene derimot kan ompakkingen ved frysing direkte skade membranstrukturen. I membraner, som i sin opprinnelige form har en flytende heterogen struktur av fosfolipider, gir frysingen opphav til faseseparasjon hvor fosfolipidene utkrystalliseres som separate "øyer" i membranen. Denne faseseparasjon er ikke reversibel og endringene påvirker membranens funksjon etter tining. I fossen tilstand vil vann, fett og vev (celler) utgjøre en fast, rigid struktur. Denne rigide strukturen av iskrystaller, cellemembran og fettvakuoler utnyttes ved en mekanisk bearbeiding av det frosne vevet. Elastisiteten av cellemembranen i frossen tilstand er borte, og det er ikke mulig for vevet i frossen tilstand å fordele krefter som utøves på dette. Påførte ytre krefter vil således være tilstrekkelig for å knuse vevet slik at oljen kan utvinnes ved moderat oppvarming. Ved hurtig innfrysning, som nevnt ovenfor, vil fordelaktig gjennomløpstiden for vevet i behandlingen skjæres ned, og lipidene og proteinene utsettes for færrest mulige angrep av oksydative stoffer som er tilstede i materialet.

I tillegg er det slik at ved sakte innfrysning vil færre kjerner dannes, og derved større iskrystaller. Etter hvert vil saltkonsentrasjonen i cellene bli så høy at den i seg selv har prooksydative egenskaper, Øket enzymaktivitet er vist i temperaturområdet for isdannelse (-2 til 0°C). Dette er også en grunn til at det er foretrukket at innfrysningsprosessen for det biologiske materialet gjøres så liten som mulig for å oppnå stabile, høykvalitetsoljer fra det biologiske materialet.

Ved foreliggende oppfinnelse utsettes ikke råstoffet for temperaturbetingelser hvor uønskede smaks- og fargestoffer er løselige i fettfasen eller som ødelegger de naturlige antioksydanter. Dette bli oppnådd ved at råstoffet først

5 fryses hurtig inn slik at vannet i materialet danner mange små iskrystaller og cellemembranene og andre cellulære komponenter holdes i en fast, rigid struktur. Etter innfrysing bearbeides råstoffet mekanisk, for eksempel med oppmaling, kverning, riving, hamring eller på annen måte.

10 Dette øker overflatearealet av det innfrosne materialet slik at separasjon av lipidene ved moderat oppvarming vil kune skilles fra resten av det biologiske materialet. Det er foretrukket, men ikke nødvendig, at den gjennomsnittlige partikkeldiameteren ved oppmalingen/opphakkingen ikke

15 overstiger 50 mm, og er fortrinnsvis ikke over 25 mm.

Opptining av materialet etter nedfrysing og bearbeidelse vil bli foretatt ved en relativt forsiktig oppvarming. Oppvarmingshastigheten vil fortrinnsvis foregå noe senere

20 enn innfrysingshastigheten, det vil si at oppvarmingen vil foregå ved en hastighet som er mindre enn 1°C/minutt. Opptiningen av materialet kan foregå enten ved å tine materialet i en ovn, ved å tilføre mikrobølger eller på annen konvensjonell måte. Forutsetningen er at opptiningen

25 ikke denaturerer proteinene i fettfasen.

Ved opptining av det frosne og bearbeidede materialet vil det være en spesiell temperatur over hvilken proteinene i materialet begynner å denaturere. Dette vil normalt

30 observeres ved at strukturen av materialet endrer seg fra å være en blanding hvor fett og proteiner holdes i et strukturgitter som normalt opptrer i slikt materiale til å gå over en mer flytende fase hvorpå strukturen, ved en gitt temperatur, raskt går over fra å være ordnet til å bli mer

35 tilfeldig idet den holdende gitterstrukturen hos materialet blir brutt ned når proteinene starter å denaturere på grunn av varmen og på grunn av økte nedbrytningsreaksjoner som foregår ved øket temperatur (se ovenfor). Det er antatt at

- denne temperaturen hvor fett/proteiner ikke er utsatt for nevneverdig nedbrytning ligger i intervallet 0 - 60°C, men det vil være en enkel sak for fagmannen å bestemme denatureringstemperaturen for det aktuelle biologiske
- 5 materialet både ved observasjon (se ovenfor) og ved måling av viskositeten for den aktuelle fettfase fra det relevante biologiske materialet. Ved adskillelse av fett og protein fra det øvrige biologiske materialet ifølge oppfinnelsen, er det en forutsetning at lipidene ved den aktuelle
- 10 temperatur (under denatureringstemperaturen for proteinene) er i flytende tilstand, slik at ikke-denaturerte proteiner og fett/olje kan separeres fra materialet på i og for seg konvensjonell måte.
- 15 Det vil også være mulig å foreta oppdelingen av materialet før nedfrysningen som beskrevet ovenfor.

Fett med en høy grad av umettethet har lavt smeltepunkt, og metoden ifølge foreliggende oppfinnelse er derfor spesielt

20 godt egnet til utskilling av råstoff som er rikt på slikt umettet fett/olje.

- Ved tradisjonell utvinning av fett fra råmaterialer hvor det brukes kraftig oppvarming av råstoffet for
- 25 fettutskillelse, vil det gjenværende materialet (graksen) bestå av blant annet denaturerte proteiner, herunder denaturert bindevev. Denne graksen har imidlertid dårlig næringsverdi som proteinkilde på grunn av dårlig fordøyelighet. En alternativ metode for utvinning av fett
- 30 ved lav temperatur, og spesielt hvor størstedelen av proteinene ikke denatureres, gir en grakse med langt høyere næringsverdi. Ved en slik lavtemperaturprosess denatureres ikke proteinene og oksydasjonen av lipidene hemmes. En slik grakse vil derfor være en god kilde for både
- 35 fosfolipider og proteiner.

Oppfinnelsen vil nedenfor bli illustrert ved enkelte eksempler.

I forsøk 1 ble denatureringstemperaturen for proteiner i torskellever bestemt ved å måle koaguleringsstemperaturen gitt ved viskositeten for torskelleverprotein i en
5 suspensjon av dette materialet. Viskositeten av torskelleverprotein (CLP) ble målt ved forskjellige temperaturer i området 10-80°C for å bestemme effekten av proteinkoagulering av viskositeten av suspensjonen. Til
10 forsøket ble det brukt frossen, rensset torskellever, og målingene ble foretatt med et Brookfield viskosimeter, spindelnummer LV3, hastighet 60 rpm.

300 ml CLP ble omrørt i et 400 ml beger som var plassert på et vannbad. Temperaturen ble øket etter hver måling. Før
15 viskositetsmålingen ble den faktiske temperatur av CLP i begeret målt (80°C var den maksimale temperaturen som kunne bli oppnådd med denne apparaturen).

Resultatene av målingene er satt opp i tabell 1 nedenfor
20 samt i en kurve gitt i figuren til svarende tabell 1. Viskositeten av torskelleverprotein ble målt for temperaturintervallet 10-80°C, og viskositeten ble målt 2
ganger ved hver temperatur. To suspensjoner fra samme materiale ble undersøkt (serie 1 og serie 2). Målingene
25 ble ikke kalibrert med en blindprøve av kjent viskositet, men dette er heller ikke nødvendig idet det kun er den relative viskositetsendring av materialet som er av interesse.

30 Ut fra tabellen og den tilsvarende kurve vil det observeres at viskositeten for CLP minsker fra 10 til 40°C, viskositeten øker fra 40 til 75°C og fra 70-75°C er det en sterk synlig koagulering og en sterk økning i viskositeten for materialet.

35

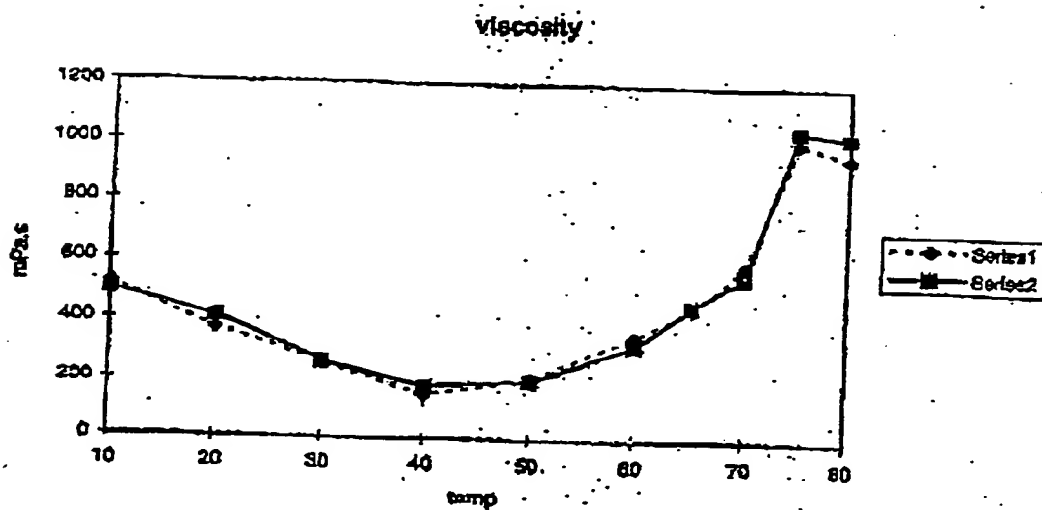
Det regnes at denaturering av proteinene starter når viskositeten øker forbi den viskositeten som materialet

hadde ved 10°C. Over 75°C er proteinene i CLP fullstendig denaturert, noe som vises ved en knekk i viskositetskruven.

Ved de øvrige forsøk ble det påsett at temperaturen og
5 temperatursenkning og økningene ikke oversteg de ovenfor
angitte verdier og intervaller ifølge oppfinnelsen.

Tabell 1:

Temperatur °C	Viskositet (mPa·s)	
	Serie 1	Serie 2
10	520	600
20	370	410
30	260	260
40	150	180
50	208	200
60	350	320
65	450	460
70	680	560
75	1010	1050
80	960	1030



Eksempel 1.

180 g lever fra torsk (*Gadus morhua*) ble avkjølt og senere
 5 frosset til en kjernetemperatur på -6°C . Deretter ble
 leveren homogenisert i frossen tilstand. Fettet ble
 frigjort ved at råstoffet ble oppvarmet til $+6^{\circ}\text{C}$. Fett,
 vann og protein ble så skilt ved at massen ble sentrifugert
 i 5 minutter ved 3000 rpm. Utbytter av fett ved denne
 10 metoden er 84%. Fettet som utvinnes har høy oksydativ
 stabilitet, peroksyverdi (PV) $\sim 0,5$ meq, anisidinverdi
 (AV) ~ 0 , den er tilnærmet fargeløs, har en mild, nøytral
 smak og en høyere grad av umettethet enn olje utvunnet ved
 tradisjonelle metoder. For sammenligning ble fett fra 180
 15 g torskelerver utvunnet ved hjelp av tradisjonelle metoder
 ved bruk av direkte damp. Utbyttet av fett ble ved bruk av
 denne metoden 81%, fettet som ble utvunnet hadde en PV ~ 2
 meq og en AV ~ 11 . Den er gul av farge, har en typisk
 transmak og en lavere grad av umettethet enn produktet
 20 utvunnet ved metoden ifølge oppfinnelsen.

Eksempel 2

Muskel fra fersk laks (*Salmo salar*) ble frosset til -6°C og
 deretter homogenisert i frossen tilstand. Fettet ble
 25 frigjort ved at råstoffet ble varmet opp til 10°C , og
 fettet ble skilt fra vann og vannløselig protein ved at
 massen ble sentrifugert i 10 minutter ved 3000 rpm.
 Verdiene for sluttproduktet ble bestemt til PV $\sim 0,5$ meq og
 AV ~ 0 .

30

For sammenligning ble fett fra laksemuskel utvunnet ved
 bruk av en ikke-industriell metode (Bligh, e.g og Dyer,
 W.J., "A rapid method of total lipid extraction and
 purification", Can. J. Bioch. Phys., 37, 1959, s. 911-917).

35

Fettet som ble utvunnet hadde en PV ~ 1 meq og en AV ~ 0 .

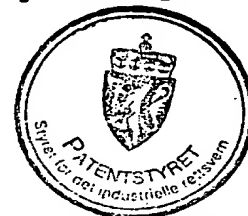
Eksempel 3

- Muskel fra hel frossen makrell (*Scomber scombrus*) ble kjøpt fra en lokal matvarebutikk (helfrossen, kjernetemperatur - 10°C) og homogenisert ved hjelp av en kvern. Fettet ble
- 5 frigjort ved at råstoffet ble varmet opp til 10°C. Fett, vann og protein ble skilt ved at massen ble sentrifugert i 10 minutter ved 3000 rpm. Verdiene for sluttmaterialet var PV-7 og AV-1,2.
- 10 For sammenligning fra det innkjøpte makrellpartiet utvunnet ved bruk av en ikke-industriell metode (Bligh & Dyer, supra). Fettet som her ble utvunnet hadde en PV-35 meq og en AV-7.
- 15 Ved anvendelse av separasjonsmetoden ifølge oppfinnelsen, kan frysing/tining av materialet bli foretatt enten kontinuerlig eller semikontinuerlig. Ved kontinuerlig frysing/tining kan materialet føres kontinuerlig gjennom en sone med lav/høy temperatur eller ved tining gjennom en
- 20 sone av mikrobølger, og ved semikontinuerlig eller intermitterende frysing/tining kan separate posjoner av materiale fryses og tines som beskrevet ovenfor ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen.



P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte ved utvinning og separering av materiale
som er av organisk biologisk opprinnelse og som
5 inneholder lipider og proteiner, hvor materialet enten
fryses og oppdeles i mindre biter eller vise versa,
hvorpå materialet bearbeides mekanisk mens det er
frossent for å bryte cellemembranene i det biologiske
materiale for derved å ødelegge strukturelle
10 komponenter i materialet,
k a r a k t e r i s e r t v e d at materialet derpå
tines til en temperatur innenfor området fra 0°C til
60°C, men under denatureringstempertauren for
materialets protein, hvorpå protein og fett/lipider
15 skilles ut fra blandingen på i og for seg kjent måte
idet materialet separeres ved en temperatur fra 0°C til
60°C forutsatt at lipidene ved disse forhold er i
væsketilstand og hvor proteinene ikke denatureres under
separeringen.
20
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at frysing/tining
av materialet blir foretatt kontinuerlig.
- 25 3. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at frysing/tining
av materialet blir foretatt semikontinuerlig.
4. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 1 - 3,
30 k a r a k t e r i s e r t v e d at materialet
kjøles ned til en temperatur fra -3°C til -50°C,
foretrukket i området fra -5°C til -28°C.
5. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 1 - 4,
35 k a r a k t e r i s e r t v e d at den mekaniske
bearbeidelse av materialet er en eller flere av
bearbeidelsesmetodene kverning, hakking eller pressing.



S a m m e n d r a g

Det er beskrevet en fremgangsmåte ved separering av fett/lipider samt protein fra materiale av organisk opprinnelse hvor fettet separeres ved lav temperatur og hvor proteinene separeres ved under sin denaturerings-temperatur for å beholde sin biologiske funksjon og sin ernæringsmessige verdi.

